

化学物質の毒性発現に関わる蛋白質群の網羅的スクリーニング法の確立とその応用

著者	朱 俊軒
号	48
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬博第519号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00121660

化学物質の毒性発現に関わる蛋白質群の網羅的スクリーニング法の確立と その応用

生体防御薬学分野
B1YD1034 朱 俊軒

化学物質による環境汚染が進行しており、それら化学物質が人の健康に与える影響が社会的に懸念されている。ほとんどの化学物質は毒性発現機構が明らかにされていないが、毒性発現機構が判明している化学物質の中には細胞の生存に必須な蛋白質（標的蛋白質）の活性を選択的に阻害することによって細胞毒性を発揮しているものが存在する。この標的蛋白質を効率よく検索することができれば毒性発現機構の解明の近道となるが、有効な方法はほとんど確立されていない。そこで本研究では標的蛋白質の検索方法として、真核生物モデルとして汎用され取り扱いが容易な出芽酵母を利用した網羅的スクリーニング方法の確立を目指した。

酵母は約 6,000 種の遺伝子を持っており、そのうちの約 1,000 種は生存に必須な蛋白質をコードしている。そこでまず、これら必須遺伝子をそれぞれ高発現させるプラスミドの作製を試みた。その結果、様々な理由により一部の遺伝子については高発現プラスミドを作製することができなかったが、最終的に 869 種の必須遺伝子をそれぞれ高発現させるプラスミドを作製することができた。そして、それらを導入した酵母株ライブラリー（809 株が生存可能）を構築し、その酵母株について 1 株ずつ化学物質に対する感受性を調べて高発現によって酵母に化学物質耐性を与える必須遺伝子を網羅的にスクリーニングする方法を確立した。このスクリーニング方法を用いて様々な化学物質について検討を行ったところ、高発現によって酵母に化学物質に対する耐性を与える遺伝子を多数同定することに成功した（亜ヒ酸：11 種、カドミウム：4 種、過酸化水素：2

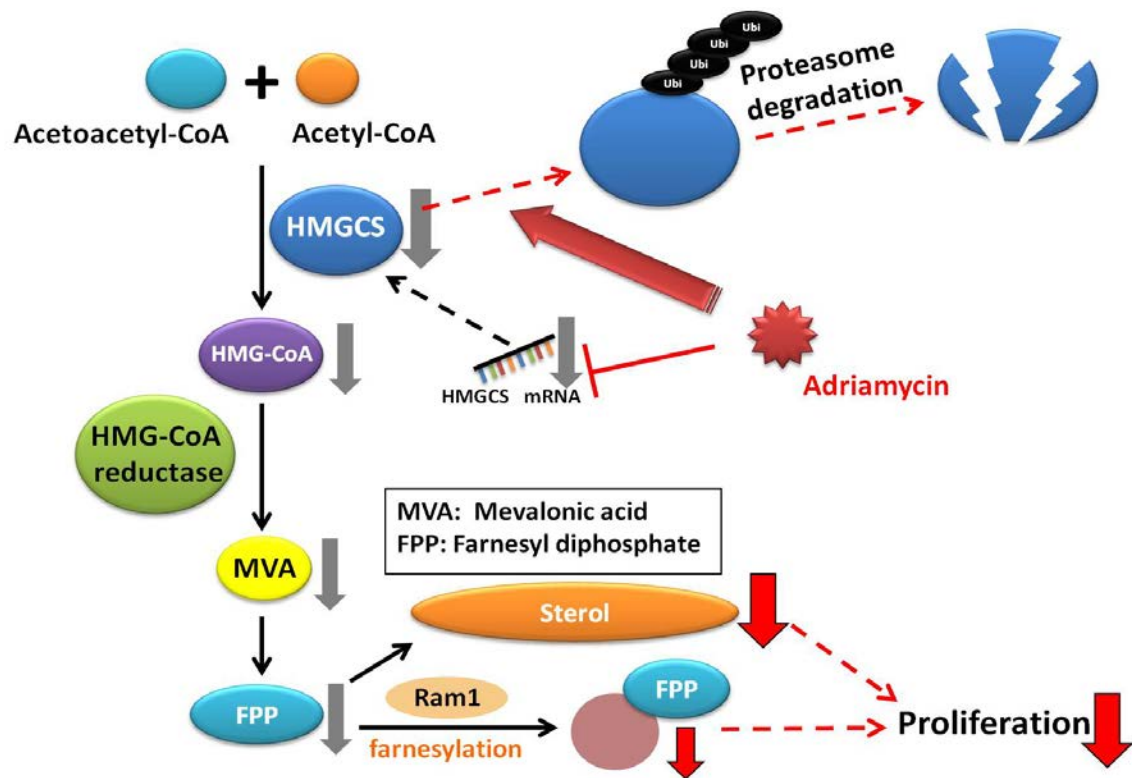
種、パラコート：7種、メチル水銀：1種、アドリアマイシン：5種)。同定された遺伝子の中には、既知の化学物質耐性遺伝子も含まれていたが、ほとんどはこれまでに化学物質毒性との関連性が報告されていない遺伝子であった。

次に、同定された遺伝子の中からアドリアマイシン耐性遺伝子として同定された **ERG13** を選択して作用機構解析を行った。**ERG13** はメバロン酸経路中の酵素の1つである **HMG-CoA synthase (HMGCS)** をコードする遺伝子であり、本経路は酵母からヒトまで広く保存されている。**HMGCS** の高発現は酵母のみならずヒト培養細胞（乳がん由来 **MCF7** 細胞）にもアドリアマイシン耐性を与えることが確認された。その機構について検討したところ、**HMGCS** の細胞内レベルがアドリアマイシンによって濃度依存的に低下することが判明し、その低下はプロテアソーム阻害剤処理によってほとんど認められなくなった。アドリアマイシン処理による **HMGCS** のユビキチン化の促進も観察されたことから、アドリアマイシンは **HMGCS** のユビキチン・プロテアソームシステムによる分解を促進することによって細胞内 **HMGCS** レベルを低下させると考えられる。

siRNA を用いて **HMGCS** の発現を抑制したところ、**siRNA** の濃度依存的に **HMGCS** の細胞内レベルとほぼ同様のパターンで細胞生存率が低下した。この際に認められた細胞内 **HMGCS** レベルの低下と細胞生存率との間の相関直線はアドリアマイシン処理時とほぼ同じ傾きであった。また、アドリアマイシン処理および **HMGCS** ノックダウンが共に細胞生存率およびアポトーシス誘導率にほとんど影響を与えない条件下において細胞増殖率を顕著に低下させることも判明し、細胞内 **HMGCS** レベルの低下が細胞増殖を選択的に抑制することが示唆された。また、メバロン酸経路において **HMG-CoA** を経て合成されるメバロン酸を培地中へ添加することによってアドリアマイシンの細胞毒性が軽減された。したがって、アドリアマイシンは細胞内 **HMGCS** の酵素活性低下を介して

メバロン酸合成を抑制し、その結果としてメバロン酸由来の生理活性物質の細胞内レベル低下を引き起こすことによって細胞の増殖を抑制していると考えられる。

アドリアマイシンによるメバロン酸レベル低下を介した細胞増殖抑制機構に関わるメバロン酸由来の生理活性物質の合成経路について出芽酵母を用いて検討したところ、ステロール合成経路およびファルネシル化修飾機構に関わる酵素の欠損がアドリアマイシンの細胞増殖抑制作用を増強させることが明らかになった。また、ファルネシル化修飾を受ける可能性がある酵母蛋白質 8 種について検討したところ、機能未知蛋白質である **Gis4** のファルネシル化がメバロン酸低下による細胞増殖抑制に関与していることが判明した。したがって、アドリアマイシンは **HMGCS** の分解促進を介して細胞内メバロン酸レベルを減少させ、ステロールの合成や蛋白質 (**Gis4** など) のファルネシル化修飾を低下させることによって、細胞の増殖を抑制すると考えられる (**Fig. 29**)。近年、メバロン酸合成が亢進しているがん細胞の存在やメバロン酸経路を抑制する薬剤の抗腫瘍効果についての報告がされており、メバロン酸経路ががん治療の標的として注目されている。したがって、本知見はメバロン酸経路を標的としたがん治療を開発する上で有用な情報を与えるものと考えられる。また、本スクリーニングによって得られた化学物質耐性遺伝子の産物を解析することによって、化学物質の標的分子およびその毒性発現機構が解明されるものと期待される。



The mechanism of adriamycin cytotoxicity via downregulation of HMGCS by adriamycin.

論文提出者：朱 俊軒

論文審査委員 (主査)：永沼 章

論文題目：化学物質の毒性発現に関わる蛋白質群の網羅的スクリーニング法の確立とその応用

毒性発現機構が明らかにされている化学物質はごくわずかしかない。毒性発現機構が判明している化学物質の中には細胞の生存に必須な蛋白質 (標的蛋白質) の活性を選択的に阻害することによって細胞毒性を発揮しているものが存在する。そこで本研究では、真核生物モデルとして汎用され取り扱いが容易な出芽酵母を用いて、化学物質の標的蛋白質を網羅的にスクリーニングする方法の樹立を目的とした。

酵母の必須遺伝子 (約1,000種) をそれぞれ高発現する酵母の作製に挑んだ結果、最終的に809種の必須遺伝子を高発現する酵母を作製することに成功した。そして、これら酵母 (809株) について1株ずつ化学物質に対する感受性を調べることによって、高発現によって酵母に化学物質耐性を与える必須遺伝子を網羅的にスクリーニングする方法を確立した。このスクリーニング法によって、これまでに化学物質毒性との関連性が報告されていない遺伝子を新たに多数同定することができた。

これら遺伝子の中からアドリアマイシン耐性遺伝子として同定されたERG13を選んで作用機構を詳細に解析した。ERG13はメバロン酸経路中の酵素の1つであるHMG-CoA synthase (HMGCS) をコードする遺伝子であり、HMGCSの高発現は酵母のみならずヒト乳がん由来のMCF7細胞にもアドリアマイシン耐性を与えた。アドリアマイシンが同細胞内のHMGCS蛋白質レベルを有意に低下させることが判明し、その機構がアドリアマイシンによるHMGCSのユビキチン・プロテアソームシステムによる分解促進であることが明らかとなった。siRNAを用いてHMGCSの発現を抑制した際にもMCF7細胞の生存率低下が観察され、この際に認められた細胞内HMGCSレベルの低下と細胞生存率との間の相関直線はアドリアマイシン処理時とほぼ同じ傾きであった。メバロン酸の培地中への添加によってアドリアマイシン毒性が軽減されたことから、アドリアマイシンは細胞内HMGCSの酵素活性低下を介してメバロン酸合成を抑制し、その結果としてメバロン酸由来の生理活性物質の細胞内レベル低下を引き起こすことによって細胞の増殖を抑制していると考えられる。また、アドリアマイシンによるメバロン酸レベル低下を介した細胞増殖抑制機構に関わるメバロン酸由来の生理活性物質の合成経路について酵母を用いて検討したところ、ステロール合成またはファルネシル化修飾に関わる経路を抑制するとアドリアマイシンの細胞毒性が増強されることが明らかとなり、両経路がアドリアマイシン毒性の発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究は、化学物質の標的となる必須蛋白質の網羅的スクリーニング方法を樹立すると共に、アドリアマイシンの新しい毒性発現機構を明らかにしたものであり、本研究で得られた知見は毒性学的に極めて価値の高いものである。よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。